

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/395, 45/00, 38/20, 38/21</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/18997</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年4月22日 (22.04.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/04645 <b>(22) 国際出願日</b> 1998年10月14日 (14.10.98) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/280759 1997年10月14日 (14.10.97) JP 特願平10/222024 1998年8月5日 (05.08.98) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 小阪昌明(KOSAKA, Masaaki)[JP/JP] 〒770-8075 徳島県徳島市八万町千鳥11-10 Tokushima, (JP) 小石原保夫(KOISHIHARA, Yasuo)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: POTENTIATOR FOR ANTIBODY AGAINST LYMPHOID TUMOR</b> <b>(54) 発明の名称</b> リンパ球系腫瘍に対する抗体の作用増強剤  <b>(57) Abstract</b> A potentiator for an antibody containing a biological response modifier as the efficacious component, binding specifically to the protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 for lymphatic disease remedy, and having a cytotoxic activity.		

(57)要約

生体応答修飾剤を有効成分として含有する、リンパ球系治療のための配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体の作用増強剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア						

## 明 細 書

## リンパ球系腫瘍に対する抗体の作用増強剤

## 発明の分野

本発明は、リンパ球系腫瘍に発現される蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有するリンパ球系腫瘍の治療のための、生体応答修飾剤（BRM）を有効成分として含有する作用増強剤に関する。

## 背景技術

リンパ球系細胞は、生体において主に免疫を担当する細胞である。リンパ球系細胞は全て同じ血液幹細胞に由来し、骨髓中あるいはその他の器官で様々な分化因子、または増殖因子の作用を受けて分化を繰り返した後、末梢血中へ放出される。この分化の違いによりリンパ球系細胞はB細胞とT細胞に大別される。B細胞は抗体産生能を、T細胞は抗原提示能、細胞傷害能その他様々な能力を有していると考えられている。この分化段階で何らかの原因により腫瘍化し、骨髓中、リンパ組織中、末梢血中等で異常増殖するようになったものが、リンパ球系腫瘍である。

近年の新しい技術導入、特に細胞表面の分化抗原に対するモノクローナル抗体を用いた技術の進歩により、リンパ球系細胞の由来や分化段階の同定が可能になった。それに伴い、リンパ球系腫瘍についてもその腫瘍細胞の由来がT細胞なのかB細胞なのかだけでなく、成熟度の同定までもが可能になった。

リンパ球系腫瘍はその腫瘍細胞の起源あるいは成熟度によりB細胞腫瘍およびT細胞腫瘍に大別される。B細胞腫瘍は腫瘍細胞の成

熟度によって、急性Bリンパ性白血病（B-ALL）、慢性Bリンパ性白血病（B-CLL）、pre-Bリンパ腫、Burkittリンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫、骨髄腫等に分類される。また、T細胞腫瘍はその腫瘍細胞の成熟度によって、急性Tリンパ性白血病（T-ALL）、慢性Tリンパ性白血病（T-CLL）、成人T細胞白血病（ATL）、非ATL末梢性Tリンパ腫（PNTL）等に分類される（図解臨床〔癌〕シリーズNo.17 白血病・リンパ腫、杉村隆ら、MEDICAL VIEW社、1987、B細胞腫瘍、高月清、西村書店、1991）。

近年の医療技術の進歩にも関わらず、リンパ球系腫瘍の治療に関しては未だ不十分であると言わざるを得ない。例えば、急性リンパ性白血病（ALL）の治癒率は20%以下である。また、リンパ腫の場合、Bリンパ腫は多剤併用療法の進歩により比較的治癒率は高いというものの、進行期での治癒率は50%程度である。さらにTリンパ腫はより難治性であり、治癒率は約30%、成人T細胞白血病（ATL）に至っては10%にも満たないのが現状である。

一方、Goto, T.らは、ヒト骨髄腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体（抗HM1.24抗体）を報告している（Blood（1994）84, 1922-1930）。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと（小阪昌明ら、日本臨床（1995）53, 627-635）から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。

一方、腫瘍患者は免疫機能低下の合併が多く、またこれが発癌に関係するとの考えから、その是正が試みられる。生体応答修飾剤（Biological response modifiers; BRM）は生体の腫瘍に対する直接

的及び／又は間接的応答力を生体にとって有利な方向へ導く働きがあり、これが治療に利用される。主にマクロファージ、T細胞などの機能を増強し、免疫能などを回復する。非特異的免疫賦活物質を用いた治療研究の時代から今や種々のサイトカインについて、その生物活性が検討され、有効と考えられるものについては量産が行われている（今日の治療薬（1995年版）、編著者永島裕、宮本昭正（株）南江堂、1995年6月20日第17版第3刷発行）。

#### 発明の開示

現在行われているリンパ球系腫瘍の治療には、種々の化学療法、X線療法、骨髄移植等が挙げられるが、上記のごとく、いずれの治療法も未だ完全ではなく、リンパ球系腫瘍を寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。

従って、本発明の目的は、リンパ球系腫瘍に対する新しい作用増強剤を提供することである。

本発明者らは、かかる治療法を提供すべく、抗HM1.24抗体（Goto, T.ら Blood (1994) 84, 1922-1930）と生体応答修飾剤との併用を検討することにより、より強い細胞傷害活性が得られること、及び特に細胞傷害活性が低下している場合に健常なレベルの細胞傷害活性が得られ、リンパ球系腫瘍に対する抗腫瘍効果が期待されることを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は生体応答修飾剤を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍の治療のための配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する蛋白

質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍の治療のための生体応答修飾剤の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、リンパ球系腫瘍がT細胞腫瘍である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、リンパ球系腫瘍がB細胞腫瘍である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、B細胞腫瘍が骨髄腫である上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体がモノクローナル抗体である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、細胞傷害活性がADCC活性である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体がヒト抗体定常領域C $\gamma$ を有する、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、ヒト抗体定常領域C $\gamma$ がC $\gamma$ 1またはC $\gamma$ 3である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体が抗HM1.24抗体である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体がキメラ抗体またはヒト型化抗体である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体がキメラ抗HM1.24抗体である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体がヒト型化抗HM1.24抗体である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体が抗HM1.24抗体が認識するエピトープと特異的に結合する、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、生体応答修飾剤が、インターフェロン、OK 4 3 2、レンチナン、ソニフィラン、ペスタチン、クレスチン、N-CWS、ラバミゾール、G-CSF、IL-2、IL-10、IL-12又はIL-15である、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、抗体が、E/T比が50の条件下でADCC活性が25%を下まわる細胞傷害活性を有する、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、ADCC活性をCr（クロム）リリースアッセイにより測定する、上記の作用増強剤を提供する。

本発明はまた、ex vivo で使用される、上記のいずれかに記載の作用増強剤を提供する。

本発明はさらに、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体と生体応答修飾剤から成るリンパ球系腫瘍の治療剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1はエフェクター細胞として健常人末梢血由来細胞を用いた場合、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して強い細胞傷害活性を示すことを表すグラフである。

図2はエフェクター細胞として免疫機能の低下した骨髓腫患者末梢血由来細胞を用いた場合、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して細胞傷害活性を示すことを表すグラフである。

図3はエフェクター細胞として骨髓腫患者大量サイクロフォスファミド治療後のアフエレーシスした細胞を用いた場合、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して細胞傷害活性を示すことを表すグラフである。

## 発明の実施の形態

### 1. 抗体の作製

#### 1-1. ハイブリドーマの作製

本発明で使用される抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPMM2（特開平7-236475）やKPC-32（Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400）を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

なお、感作抗原として使用される、配列番号5に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌（*E. coli*）は、平成5年（1993年）10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pRS38-pUC19）として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特開平7-196694参照）。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含



むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。

具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 2

77: 131-133 ) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46 ) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG )、センダイウィルス (HVJ ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS ) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000 程度のPEG 溶液を通常、30-60 % (w/v ) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに

十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93-12227, WO 92-03918, WO 94-02602, WO 94-25585, WO 96-34096, WO 96-33735参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

具体的には、抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマの作製は、Goto, T.らの方法（Blood（1994）84, 1922-1930）により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをBA

LB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗HM1.24抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II 培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培養上清から抗HM1.24抗体を精製する方法で行うことができる。

#### 1-2. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chmczynski, P. ら、(1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl

. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932 ) を使用することができる。得られたPCR 産物から目的とするDNA 断片を精製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNA の塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV 領域をコードするDNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域(C 領域)をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV 領域をコードするDNA を、抗体C 領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

### 1-3. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(Humanized)抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V 領域をコードするDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96-02576 参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) およびEscherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8（1996）年8月29日に、各々FERMBP-5646 およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（国際特許出願公開番号W098-14580参照）。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号W0 96-02576 参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 96-02576 参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

例えば、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖 $\alpha$ バージョンおよびH鎖 $\gamma$

バージョンを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk) および *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8（1996）年8月29日に、各々 FERM BP-5645 および FERM BP-5643 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（国際特許出願公開番号 W098-14580 参照）。また、H鎖sバージョンを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成9（1997）年9月29日に、各 FERM BP-6127 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖aバージョン、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖rバージョン、及びヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖sバージョンの各々のV領域のアミノ酸及び塩基配列を、配列番号2、3及び4に示す。配列番号2、3及び4において、-15位のアミノ酸から-1位のアミノ酸はシグナル配列である。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、細胞傷害活性を呈するヒト抗体C領域として、ヒトC $\gamma$ 例えば、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4を使用することができる。これらのうち、特にC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 3を有する抗体が強力な細胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC活性を有し、本発明に好適に使用される。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域（framework region; FR）およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号W098-14580参照）。

#### 1-4. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV 40）等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$ （HEF1 $\alpha$ ）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法（Nature（1979）277, 108）、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法（Nucleic Acids Res.（1990）18, 5322）に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーター



を使用する場合、Wardらの方法（Nature（1988）341, 544-546；FASEB J.（1992）6, 2422-2427）、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法（Science（1988）240, 1041-1043）に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol.（1987）169, 4379）を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド（refold）して使用する（例えば、W096-30394を参照）。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、（1）哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa, Vero、（2）両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは（3）昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ（Nicotiana）属、例えばニコティアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）由来の細胞が知られており、こ

れをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640、IMDMなどを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を

雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature(1985)315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えば pMON530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* または *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの

分野においてすでに確立されている。

## 2. 抗体の分離、精製

### 2-1. 抗体の分離、精製

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムなどが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. 等が挙げられる。

その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

### 2-2. 抗体の濃度測定

2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションし、抗体を固着化する。

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

### 3. FCM 解析

リンパ球系腫瘍と本発明で使用する抗体との反応性は、FCM (フローサイトメトリー) 解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。例えば樹立細胞株として、T細胞株であるRPMI 8402 (ATCC CRL-1995)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-CEM (ATCC CCL 119)、急性リンパ性白血病由来HPB-ALL (FCCH1018)、Tリンパ腫由来HPB-MLT (FCCH1019)、急性リンパ性白血病由来JM (FCCH1023)、急性リンパ芽球性白血病由来MOLT-4 (ATCC CRL 1582)、急性リンパ性白血病由来Jurkat (FCCH1024)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-HSB-2 (ATCC CCL 120.1)、成人T細胞白血病由来MT-1 (FCCH1043)、レンネルトリリンパ腫由来KT-3 (Shimizu, S. et al., Blood (1988) 71, 196-203)などを、

また、B細胞株としてEBウィルス形質転換細胞CESS (ATCC TIB 190)、EBウィルス陽性B細胞SKW 6.4 (ATCC TIB 215)、Bリンパ腫由来MC116 (ATCC CRL 1649)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-SB (ATCC CCL 120)、急性骨髄性白血病患者由来B細胞RPMI 6410 (FCCH6047)、Burkittリンパ腫由来Daudi (ATCC CCL 213)、Burkittリンパ腫由来EB-3 (ATCC CCL 85)、Burkittリンパ腫

由来Jijoye (ATCC CCL 87)、Burkitt リンパ腫由来Raji (ATCC CCL 86) などを、さらに非T非B細胞株として急性骨髄性白血病由来HL-60 (ATCC CCL 240)、急性単球性白血病由来THP-1 (ATCC TIB 202)、組織球性リンパ腫由来U-937 (ATCC CRL 1593)、慢性骨髄性白血病由来K-562 (ATCC CCL 243)、骨髄腫由来RPMI 8226 (ATCC CCL 155)、同U266B1 (ATCC TIB 196)、同KPM2、同KPC-32、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL 1621) などを用いることができる。

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 $\mu$ g/mlに希釈した抗体あるいはコントロール抗体100 $\mu$ lを加え、氷温化30分インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、25 $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM, Becton Dickinson製)100 $\mu$ lを加え、氷温化30分間インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、600 $\mu$ lあるいは1mlのFACS緩衝液に懸濁し、FACSscan (Becton Dickinson製)で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

#### 4. 細胞傷害活性

##### 4-1. ADCC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞傷害活性として、例えば、ADCC活性を有する抗体である。

本発明においてリンパ球系腫瘍に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球分離し、エフェクター細胞(Effector cell:E)として調製する。

また、標的細胞(Target cell:T)としてはRPMI8226(ATCC CCL 155)、CCRF-CEM(ATCC CCL 119)、(ATCC CCL 120.1)、HPB-MLT (FCCH1019)、EB-3(ATCC CCL 85)、MC116(ATCC CRL 1649)、

CCRF-SB (ATCC CCL 120), K-562 (ATCC CCL 243)などを $^{51}\text{Cr}$ により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用いることができる。細胞傷害活性(%)は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性(cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性(cpm)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性(cpm)である。

#### 4-2. 細胞傷害活性の増強

ADCC活性のような細胞傷害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域(C領域)としてC $\gamma$ 、特にC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 3を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。

例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化(Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY(1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化(Smith, R. I. F. et al., J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現(Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化(Caron, P. C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195, Shope, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化(Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53,

2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入(Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384)が挙げられる。これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

#### 5. 治療対象

本発明は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体の、生体応答修飾剤を有効成分として含有する、リンパ球腫瘍の治療のための作用増強剤を提供する。その治療対象は通常のヒトリンパ球系腫瘍患者であるが、本発明は特に免疫機能が低下したヒト患者に適用することが、後述の実施例に記載するとおり、明らかになった。「免疫機能が低下した」とはADCCのような細胞傷害活性が低下していることを意味する。

具体的には、E/T比が50の条件下でADCC活性が25%を下まわる細胞傷害活性しか見いだされない場合に特に有効である。25%を下まわるADCC活性は、抗癌剤の投与等により免疫機能が低下した際に見いだされる。上記ADCC活性を測定する際には、培養時間(インキュベーション時間)が4時間であるのが好ましい。また、ADCC活性の測定方法としては、Cr(クロム)リリースアッセイまたはトリパンブルーによる染色方法が好ましい。

#### 6. 生体応答修飾剤

本発明において有効成分として含有される生体応答修飾剤(BRM; Biological Response Modifier)は、免疫賦活作用を有する物質である。生体応答修飾剤としては本発明の効果を達成する限りいずれのものでもよい。生体応答修飾剤の好ましい例としては、インター



フェロン、OK432、レンチナン、ソニフィラン、ペスタチン、クレスチン、N-CWS、ラバミゾール、G-CSF、IL-2、IL-10、IL-12又はIL-15である（今日の治療薬（1995年版）、編著者水島裕、宮本昭正、（株）南江堂、1995年6月20日第17版第3刷発行；サイトカイン94－基礎から最新情報まで－、編者笠倉新平、（株）日本医学館、1994年7月14日第一版；図説臨床〔癌〕シリーズNo. 19（Progress in Cancer Clinics）、癌と免疫（新版）、メジカルビュー社、1993年8月31日第2版（新版）発行）。これらのうち、とくにIL-2が好ましい。

これらの生体応答修飾剤は、細胞傷害活性の反応において、エフェクター細胞に作用してエフェクター細胞の細胞傷害活性を賦活する物質である。これらの生体応答修飾剤は公知の方法により製造することができ、あるいは市販されているものを使用することができる。

#### 7. 投与経路および製剤

本発明の作用増強剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、抗体については一回につき体重1 Kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000 mg、好ましくは5～50 mgの投与量を選ぶことができる。生体応答修飾剤については、一回につき体重1 kgあたり1単位から1,000,000単位の範囲で選ばれる。

本発明においては、配列番号：1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体の作用を増強する生体応答修飾剤は、抗体の作用を増強する限り該抗体を

治療対象、例えばヒトの腫瘍患者に投与する前に投与されてもよいし、後に投与されてもよい。

また、該抗体と同時に投与することもできる。

本発明においては、該抗体と生体応答修飾剤を治療対象、例えばヒトの腫瘍患者に投与するのみならず、*ex vivo* の治療にも使用することができる。すなわち、患者の末梢血よりエフェクター細胞を取り出し、生体応答修飾剤によりその免疫機能を賦活した後、エフェクター細胞を患者にもどす。エフェクター細胞を患者にもどす前または後あるいはそれと同時に該抗体を投与することができる。本発明においては、P B S C T（末梢血幹細胞移植）のアフェレーシスの際にも使用することができる。すなわち、P B S C Tにおいて取り出した幹細胞をもどす際に該抗体と生体応答修飾剤を投与してもよい。

本発明においては、該抗体と生体応答修飾剤を併用してその作用を増強する限り、上記のような形態を包含する。

本発明の作用増強剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤など

が挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

本発明の治療対象疾患としては、標的とする腫瘍細胞上に本発明で使用される抗体が結合する抗原が存在する、リンパ球系腫瘍である。具体的には、多発性骨髄腫（MM）急性Bリンパ性白血病（B-ALL）、慢性Bリンパ性白血病（B-CLL）、pre-Bリンパ腫、Burkittリンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫、急性Tリンパ性白血病（T-ALL）、慢性Tリンパ性白血病（T-CLL）、成人T細胞白血病（ATL）、非ATL末梢性Tリンパ腫（PNLT）等が挙げられる。本発明の作用増強剤は、これらリンパ球系腫瘍の治療のための作用増強剤として有用である。

#### 実施例

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例．ADCC活性の測定

ADCC（Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity）活性の測定はCurrent protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., 1993の方法に従った。

##### 1. エフェクター細胞の調製

健常人および多発性骨髄腫患者の末梢血および骨髄より比重遠心法で単核球を分離した。すなわち健常人および多発性骨髄腫患者の末梢血および骨髄に等量のPBS(-)を加え、Ficoll（Pharmacia 社製）-Conrey（第一製薬社製）（比重1.077）に積層し、400 gで30分間遠心した。単核球層を分取し、10％ウシ胎児血清（Witaker 社製

を含むRPMI1640 (Sigma 社製) で2回洗浄後、細胞をIL-2 (Genzyme 社製) 500 U/ml、IL-10 (Genzyme社製) 20ng/ml、IL-12 (R & D社製) 20ng/ml、IL-15(Genzyme 社製) 20ng/ml又はM-CSF(ミドリ十字社製) 5000 U/mlを添加しあるいは無添加(培地のみ) で3日間培養した。同培養液で各々2回洗浄後、同培養液で細胞数が  $5 \times 10^6$  /mlになるように調製した。

## 2. 標的細胞の調製

ヒト骨髓腫細胞株RPMI 8226 (ATCC CCL 155)を0.1mCiの $^{51}\text{Cr}$ -sodium chromateとともに10%ウシ胎児血清(Witaker 社製)を含むRPMI1640 (Sigma 社製) 中で37℃にて60分インキュベートすることにより放射性標識した。放射性標識の後、細胞をHanks balanced salt solution (HBSS) で3回洗浄し、 $2 \times 10^5$  /mlに調製した。

## 3. A D C C アッセイ

96ウェルU底プレート (Corning 社製) に放射性標識した  $2 \times 10^5$  /mlの標的細胞を50  $\mu$ lと、アフィニティー精製によって得られた1  $\mu$ g/mlのヒト型化抗HM1.24抗体、あるいはコントロールヒトIgG1 (Serotec 社製) 50  $\mu$ l加え、4℃で15分間反応させた。

その後、 $5 \times 10^6$  /mlのエフェクター細胞を100  $\mu$ lを加え、炭酸ガス培養器内で4時間培養した。その際、エフェクター細胞 (E) と標的細胞 (T) の比 (E : T) を50 : 1とした。

100  $\mu$ lの上清をとり、ガンマカウンター (ARC361, Aloka 社製) で培養上清中に遊離された放射活性を測定した。最大遊離放射能測定用には1%NP-40 (BRL社製) を用いた。細胞傷害活性 (%) は  $(A - C) / (B - C) \times 100$  で計算した。なおAは抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性 (cpm)およびCは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm)を示す。

その結果、エフェクター細胞として、健常人末梢血由来細胞を用いた場合、コントロールIgGではほとんど細胞傷害活性を示さなかったのに対して、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して強い細胞傷害活性を示した(図1)。エフェクター細胞として、免疫機能の低下した骨髓腫患者由来細胞を用いた場合、コントロールIgGではほとんど細胞傷害活性を示さなかったのに対して、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して細胞傷害活性を示した(図2)。

しかしながら、その活性は上記健常人の場合よりも弱かった(25%未満)。そこにIL-2, IL-10, IL-12あるいはIL-15を添加することでヒト型化抗HM1.24抗体の細胞傷害活性が増強された。特にIL-2では、健常人の場合と同等の活性にまで増強された(図2)。

また、エフェクター細胞として骨髓腫患者に対する大量サイクロフォスファミド治療後のアフエレーシスした細胞を用いた場合、上記同様に、コントロールIgGではほとんど細胞傷害活性を示さなかったのに対し、ヒト型化抗HM1.24抗体はRPMI8226細胞に対して細胞傷害活性を示した(図3)。しかしながら、その活性は健常人の場合よりも弱かった(25%未満)。そこにIL-2, IL-10あるいはIL-12を添加することでヒト型化抗HM1.24抗体の細胞傷害活性が増強された(図3)。

このことより、免疫機能の低下した患者由来のエフェクター細胞の腫瘍細胞に対する、ヒト型化抗HM1.24抗体による細胞傷害活性は、健常人あるいは免疫機能の低下していない患者由来のエフェクター細胞に比べて弱くなる。そこにIL-2等のBRMを添加することでそのエフェクター細胞の細胞傷害活性をより増強し、健常人レベルまでにも導くことができた。

したがって免疫機能の低下した患者に対しては、*in vivo*、*ex vivo* でヒト型化抗HM1.24抗体の投与時に、BRMを併用することによりさらに抗腫瘍効果を上げることが期待される。また同様に、末梢血幹細胞移植時等においてアフェレーシスした細胞を体内にもどす患者に対しても、*in vivo*、*ex vivo* でヒト型化抗HM1.24抗体の投与時に、BRMを併用することによりさらに抗腫瘍効果を上げることが期待される。

参考例1. マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1992-1930 に記載の方法にて、マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製した。

ヒト多発性骨髄腫患者骨髄由来の形質細胞株KPC-32 ( $1 \times 10^7$  個) (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) をBALB/Cマウス(チャールスリバー製)の腹腔内に6週間おきに2回注射した。

このマウスを屠殺する3日前にマウスの抗体産生価をさらに上昇させるために、 $1.5 \times 10^6$  個のKPC-32をマウスの脾臓内に注射した(Goto, T. et al., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89)。マウスを屠殺した後に脾臓を摘出し、Groth, de St. & Schreideggerの方法(Cancer Research (1981) 41, 3465)に従い摘出した脾臓細胞とミエローマ細胞SP2/0を細胞融合に付した。

KPC-32を用いたCell ELISA (Posner, M. R. et al., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23)によりハイブリドーマ培養上清中の抗体のスクリーニングを行った。 $5 \times 10^4$  個のKPC-32を50 mlのPBSに懸濁し、96穴プレート(U底型、Corning, Iwaki製)に分注し37℃で一晩風乾した。1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSでブ

ロックした後、ハイブリドーマ培養上清を加え 4℃にて2 時間インキュベートした。次いで、4℃にて1 時間ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG ヤギ抗体 (Zymed 製) を反応させ、洗浄後室温にて30 分間o-フェニレンジアミン基質溶液 (Sumitomo Bakelite 製) を反応させた。

2N硫酸で反応を停止させ、ELISA reader (Bio-Rad 製) で492nm における吸光度を測定した。ヒト免疫グロブリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを除去するために、陽性ハイブリドーマ培養上清をヒト血清にあらかじめ吸着させ、他の細胞株に対する反応性をELISA にてスクリーニングした。陽性のハイブリドーマを選択し、種々の細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで調べた。最後に選択されたハイブリドーマクローンを二度クローン化し、これをプリスタン処理したBALB/Cマウスの腹腔に注射して、腹水を取得した。

モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウムによる沈澱とプロテインA アフィニティクロマトグラフィーキット (Ampure PA、Amersham 製) によりマウス腹水より精製した。精製抗体は、Quick Tag FITC 結合キット (ベーリンガーマンハイム製) を使用することにより FITC 標識した。

その結果、30 のハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体がKPC-32およびRPMI 8226 と反応した。クローニングの後、これらのハイブリドーマの培養上清と他の細胞株あるいは末梢血単核球との反応性を調べた。

このうち、3 つのクローンが形質細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であった。これらの3 つのクローンのうち、最もフローサイトメトリー分析に有用であり、かつRPMI 8226 に対するCDC 活性を有するハイブリドーマクローンを選択し、HM1.24と名付けた。

。このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、サブクラス特異的抗マウスウサギ抗体（Zymed 製）を用いた ELISA にて決定した。抗 HM1.24 抗体は、IgG2a  $\kappa$  のサブクラスを有していた。抗 HM1.24 抗体を産生するハイブリドーマ HM1.24 は、工業技術院生命工学工業研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 7 年 9 月 14 日に FERM BP-5233 としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 参考例 2. ヒト型化抗 HM1.24 抗体の作製

ヒト型化抗 HM1.24 抗体を国際特許出願公開番号 WO 98-14580 に記載の方法により得た。

参考例 1 で作製されたハイブリドーマ HM1.24 から、常法により全 RNA を調製した。これよりマウス抗体 V 領域をコードする cDNA をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法および 5'-RACE 法により、合成、増幅した。マウス V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得、これらの DNA 断片を各々プラスミド pUC 系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を常法に従い決定し、さらに各々の V 領域の相補性決定領域（CDR）を決定した。

キメラ抗 HM1.24 抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス抗 HM1.24 抗体 L 鎖および H 鎖の V 領域をコードする cDNA を HEF ベクターに挿入した。また、再ヒト型化抗 HM1.24 抗体を作製するために、CDR 移植法によりマウス抗 HM1.24 抗体の V 領域 CDR をヒト抗体へ移植した。ヒト抗体の L 鎖としてヒト抗体 REI の L 鎖を用い、ヒト抗体 H 鎖としてフレームワーク領域（FR）1-3 についてはヒト抗体 HG3 の FR1-3 を用い FR4 についてはヒト抗体 JH6 の FR4 を用いた。CDR を移植した抗体が適切な抗原結合部位を形成するよう



にH鎖V領域のFRのアミノ酸を置換した。

このようにして作製したヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞で発現させるために、HEFベクターに、各々の遺伝子を別々に導入し、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖またはH鎖を発現するベクターを作製した。

これら二つの発現ベクターをCHO細胞に同時に導入することにより、ヒト型化抗HM1.24抗体を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られたヒト型化抗HM1.24抗体のヒト羊膜由来細胞株WISHへの抗原結合活性および結合阻害活性を、Cell ELISAにて調べた。その結果、ヒト型化抗HM1.24抗体は、キメラ抗体と同等の抗原結合活性を有し、さらにビオチン化マウス抗HM1.24抗体を用いた結合阻害活性についても、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の活性を有した。

なお、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-gk) および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8（1996）年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

また、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖aバージョンおよびH鎖rバージョンを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVL<sub>a</sub>-AHM-gk) および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVH<sub>r</sub>-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8（1996）年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖sバージョンを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5

$\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM- g  $\gamma$  1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成9（1997）年9月29日に、FERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

### 参考例3. HM1.24抗原 蛋白質cDNAのクローニング

#### 1. cDNA ライブラリーの作製

##### 1) 全RNA の調製

マウス抗HM1.24抗体が特異的に認識するHM1.24抗原蛋白質をコードするcDNAを、次のようにしてクローニングした。

すなわち、ヒト多発性骨髄腫細胞株KPM2 から、全RNA をChirgwinら（Biochemistry, 18, 5294（1979））の方法に従って調製した。すなわち、 $2.2 \times 10^6$  個のKPM2 を20 ml の4 M グアニジンチオシアネート（ナカライテスク製）中で完全にホモジナイズさせた。

ホモジネートを遠心管中の5.3 M 塩化セシウム溶液層状に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpm にて20℃で24時間遠心分離することによりRNA を沈殿させた。RNA 沈殿物を70 %エタノールにより洗浄し、そして1 mM EDTA 及び0.5 % SDS を含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4) 300  $\mu$ l 中に溶解し、それにPronase（Boehringer製）を0.5 mg/ml となるように添加した後、37℃にて30分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、RNA をエタノールで沈殿させた。次に、RNA 沈殿物を1mM EDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4) 200  $\mu$ l に溶解した。

##### 2) poly(A) + RNA の調製

前記のようにして調製した全RNA の約500  $\mu$ g を材料としてFast Track 2.0 mRNA Isolation Kit（Invitrogen製）を用いてキット添付の処方に従って poly(A)+RNA を精製した。

##### 3) cDNAライブラリーの構築

上記 poly(A)+RNA 10  $\mu$ g を材料として cDNA 合成キット TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 製) を用いてキット添付の処方に従って二本鎖 cDNA を合成し、更に Directional Cloning Toolbox (Pharmacia 製) を用いてキット付属の EcoRI アダプターをキット添付の処方に従って連結した。EcoRI アダプターのカイネーション及び制限酵素 NotI 処理はキット添付の処方に従って行った。更に、約 500 bp 以上の大きさのアダプター付加二本鎖 cDNA を 1.5 % 低融点アガロースゲル (Sigma 製) を用いて分離、精製し、アダプター付加二本鎖 cDNA 約 40  $\mu$ l を得た。

このようにして作製したアダプター付加二本鎖 cDNA を、あらかじめ制限酵素 EcoRI、NotI 及びアルカリフォスファターゼ (宝酒造製) 処理した pCOS1 ベクターと T4 DNA リガーゼ (GIBCO-BRL 製) を用いて連結し、cDNA ライブラリーを構築した。構築した cDNA ライブラリーは、大腸菌細胞株 DH5 $\alpha$  (GIBCO-BRL 製) に形質導入され、全体のサイズは約  $2.5 \times 10^6$  個の独立したクローンであると推定された。なお、プラスミド pCOS1 は、発現ベクター HEF-PMh-g  $\gamma$  1 (国際特許出願公開番号 W092-19759 参照) を EcoRI 及び SmaI 消化することにより含有される DNA を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造製) を連結することにより構築した。

## 2. 直接発現法によるクローニング

### 1) COS-7 細胞へのトランスフェクション

上記の形質導入した大腸菌約  $5 \times 10^5$  クローンを 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2-YT 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) にて培養することにより cDNA の増幅を行い、アルカリ法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) により大腸菌からプ

ラスミド DNAを回収した。得られたプラスミド DNAはGene Pulser 装置 (Bio-Rad 製) を用いてエレクトロポレーション法により COS-7細胞にトランスフェクションした。

すなわち、精製したプラスミド DNA  $10 \mu\text{g}$  を  $1 \times 10^7$  細胞/ml で PBS中に懸濁した COS-7細胞液  $0.8\text{ml}$ に加え、 $1500 \text{ V}$ 、 $25 \mu\text{FD}$ の容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞は、10 %牛胎児血清 (GIBCO-BRL 製) を含むDMEM培養液 (GIBCO-BRL 製) にて、 $37^\circ\text{C}$ 、5 % $\text{CO}_2$ の条件下で3日間培養した。

## 2) パンニングディッシュの調製

マウス抗HML.24抗体をコーティングしたパンニングディッシュを、B. Seed ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)) の方法に従って調製した。すなわち、マウス抗HML.24抗体を $10 \mu\text{g/ml}$ になるように  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH}9.5$ ) に加えた。このようにして調製した抗体溶液  $3 \text{ ml}$ を直径  $60 \text{ mm}$  の細胞培養皿に加え、室温にて2時間インキュベートした。0.15 M NaCl 溶液にて3回洗浄した後、5%牛胎児血清、1 mM EDTA、0.02 % $\text{NaN}_3$ を含むPBSを加え、ブロッキングした後、下記クローニングに用いた。

## 3) cDNAライブラリーのクローニング

前述のようにトランスフェクトした COS-7細胞は、 $5 \text{ mM}$  EDTA を含むPBS にて剥がし、5%牛胎児血清を含むPBS で一回洗浄した後、約  $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように5%牛胎児血清及び0.02%  $\text{NaN}_3$ を含むPBS に懸濁し、上記のように調製したパンニングディッシュに加えて、室温にて約2時間インキュベートした。5 % 牛胎児血清及び0.02 % $\text{NaN}_3$ を含むPBS で3度緩やかに洗浄した後、0.6%SDS 及び $10 \text{ mM}$  EDTAを含む溶液を用いてパンニングディッシュに結合した細胞からプラスミド DNAの回収を行った。

回収したプラスミド DNAを再び大腸菌DH5  $\alpha$ に形質導入し、前述のようにプラスミドDNAを増幅後、アルカリ法にて回収した。回収したプラスミド DNAを COS-7細胞にエレクトロポレーション法によりトランスフェクトして前述と同様に結合した細胞よりプラスミド DNA の回収を行った。同様の操作を更に1回繰り返して、回収したプラスミドDNAを制限酵素EcoRI およびNotIで消化した結果、約 0.9 kbpのサイズのインサートの濃縮が確認された。さらに、回収したプラスミドDNAの一部を形質導入した大腸菌を50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2-YTアガープレートに接種し、一晚培養後、単一のコロニーよりプラスミドDNAを回収した。制限酵素EcoRI およびNotIにて消化し、インサートのサイズが約 0.9 kbpを示すクローンp3.19を得た。

本クローンについては、PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencingキット (PerkinElmer 製) を用いて、キット添付の処方に従い反応を行い、ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer製) にて塩基配列の決定を行った。この塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号1 に示す。

#### 産業上の利用可能性

抗HM1.24抗体と生体応答修飾剤を併用することにより特にADC活性の低下したエフェクター細胞の細胞活性が増強された。これらのことから、抗HM1.24抗体と生体応答修飾剤を併用することによりリンパ球系腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強することが示される。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名称：工業技術院生命工学工業技術研究所  
あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (PRS38-pUC19)

寄託番号 : FERM BP-4434

寄託日 : 1993年10月 5 日

(2) 表 示 : Mouse-mouse hybridoma HM1.24

寄託番号 : FERM BP-5233

寄託日 : 1995年 4 月 27日

(3) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g  
 $\gamma$  1)

寄託番号 : FERM BP-5643

寄託日 : 1996年 8 月 29日

(4) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g  $\gamma$  1)

寄託番号 : FERM BP-5644

寄託日 : 1996年 8 月 29日

(5) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVL $\alpha$ -AHM-g  
 $\kappa$  )

寄託番号 : FERM BP-5645

寄託日 : 1996年 8 月 29日

(6) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g  $\kappa$  )

寄託番号 : FERM BP-5646

寄託日 : 1996年 8 月 29日

(7) 表 示 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$   
 $\gamma$  1)

寄託番号 : FERM BP-6127

寄託日 : 1997年 9 月 29日

## 配列

配列 : 1

配列の長さ : 1013

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

## 配列

GAATTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
AGA GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	
ATA GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
ATT ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
CGG GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
CTG ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	

ACC TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG 337  
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu  
 90 95 100 105  
 AAG GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT 385  
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr  
 110 115 120  
 ACA TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG 433  
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu  
 125 130 135  
 AGA AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC 481  
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr  
 140 145 150  
 TAC CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG 529  
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu  
 155 160 165  
 ATT GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGA GATCCCAGGA 575  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
 170 175 180  
 AGCTGGCACA TCTTGAAGG TCCGTCCTGC TCGGCTTTTC GCTTGAACAT TCCCTTGATC 635  
 TCATCAGTTC TGAGCGGGTC ATGGGGCAAC ACGGTTAGCG GGGAGAGCAC GGGGTAGCCG 695  
 GAGAAGGGCC TCTGGAGCAG GTCTGGAGGG GCCATGGGGC AGTCCTGGGT GTGGGGACAC 755  
 AGTCGGGTTG ACCCAGGGCT GTCTCCCTCC AGAGCCTCCC TCCGGACAAT GAGTCCCCC 815  
 TCTTGTCTCC CACCCTGAGA TTGGGCATGG GGTGCGGTGT GGGGGGCATG TGCTGCCTGT 875  
 TGTTATGGGT TTTTTCGCG GGGGGGGTTG CTTTTTCTG GGGTCTTTGA GCTCCAAAAA 935  
 AATAAACACT TCCTTTGAGG GAGAGCACAC CTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 995  
 AAAATTCGGG CGGCCGCC 1013

配列 : 2



配列の長さ : 3 7 9

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TCC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
-1 1 5 10	
AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCT AGT CAG GAT GTG	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
15 20 25	
AAT ACT GCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
CTG CTG ATC TAC TCG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAG CAA CAT TAT AGT	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	

ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C 379

Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

配列 : 3

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1

5

10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50

55

60

CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC 288

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65

70

75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
           80                    85                    90  
 TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
           95                    100                    105  
 TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
           110                    115                    120

配列 : 4

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
                     -1    1                    5                    10  
 CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
           15                    20                    25  
 ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
           30                    35                    40                    45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATC ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
65 70 75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
80 85 90

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
95 100 105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120

## 請 求 の 範 囲

1. 生体応答修飾剤を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍の治療のための、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体の作用増強剤。

2. 配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍の治療のための生体応答修飾剤の作用増強剤。

3. リンパ球系腫瘍がT細胞腫瘍である、請求項1又は2に記載の作用増強剤。

4. リンパ球系腫瘍がB細胞腫瘍である、請求項1又は2に記載の作用増強剤。

5. B細胞腫瘍が骨髓腫である請求項4に記載の作用増強剤。

6. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項1又は2に記載の作用増強剤。

7. 細胞傷害活性がADCC活性である、請求項1又は2に記載の作用増強剤。

8. 抗体がヒト抗体定常領域C $\gamma$ を有する、請求項6に記載の作用増強剤。

9. ヒト抗体定常領域C $\gamma$ がC $\gamma$ 1またはC $\gamma$ 3である、請求項8に記載の作用増強剤。

10. 抗体が抗HM1.24抗体である、請求項6に記載の作用増強剤。

11. 抗体がキメラ抗体またはヒト型化抗体である、請求項6に記載の作用増強剤。

12. 抗体がキメラ抗HM1.24抗体である、請求項10に記載の作用増強剤。

13. 抗体がヒト型化抗HM1.24抗体である、請求項10に記載の作用増強剤。

14. 抗体が抗HM1.24抗体が認識するエピトープと特異的に結合する、請求項1～13のいずれか1項に記載の作用増強剤。

15. 生体応答修飾剤が、インターフェロン、OK432、レンチナン、ソニフィラン、ペスタチン、クレスチン、N-CWS、ラバミゾール、G-CSF、IL-2、IL-10、IL-12又はIL-15である、請求項1～14のいずれか1項に記載の作用増強剤。

16. 抗体が、E/T比が50の条件下でADCC活性が25%を下まわる細胞傷害活性を有する、請求項1～15のいずれか1項に記載の作用増強剤。

17. ADCC活性をCr（クロム）リリースアッセイにより測定する、請求項16に記載の作用増強剤。

18. ex vivo で使用される、請求項1～17のいずれか1項に記載の作用増強剤。

19. 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞傷害活性を有する抗体と生体応答修飾剤から成るリンパ球系腫瘍の治療剤。

Fig.1

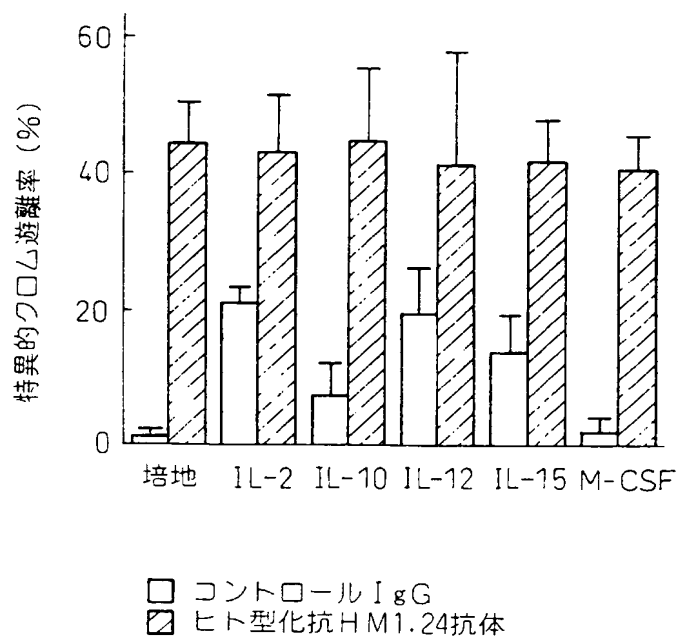


Fig. 2

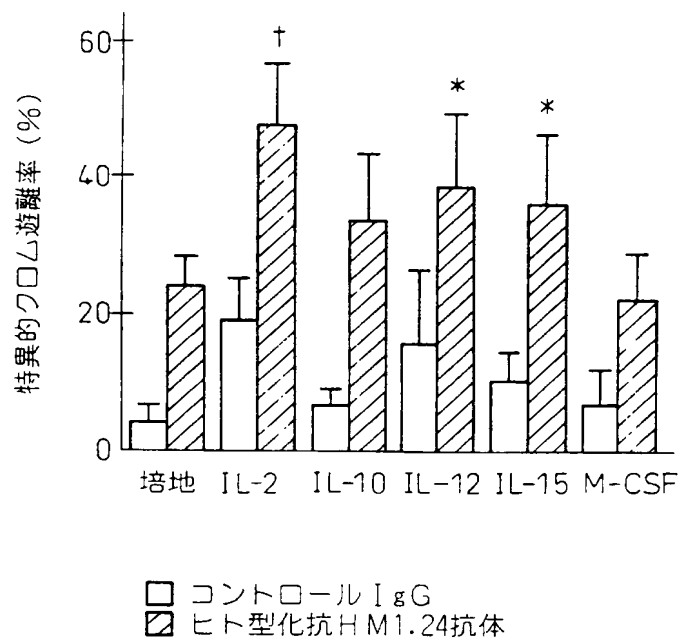
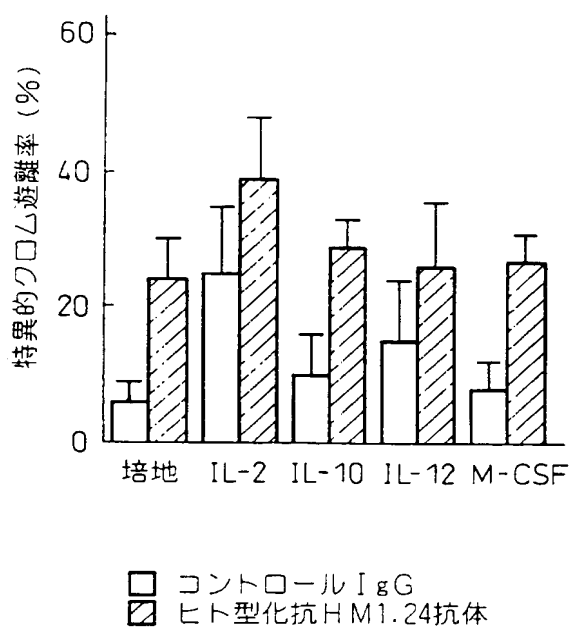




Fig. 3



## SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
 <120> Enhancer for Action of Antibody to Lymphocytic Tumor  
 s  
 <130> CGI-F886/PCT  
 <150> JP 09-280759  
 JP 10-222024  
 <151> 1997-10-14  
 1998-08-05  
 <160> 8  
 <210> 1  
 <211> 1013  
 <212> DNA  
 <213> Human  
 <400> 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1

5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10

15

20

25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30

35

40

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu

45

50

55

cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241  
 Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu  
 60 65 70  
 ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc 289  
 Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala  
 75 80 85  
 acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337  
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu  
 90 95 100 105  
 aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385  
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr  
 110 115 120  
 aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433  
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu  
 125 130 135  
 aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481  
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr  
 140 145 150  
 tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529  
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu  
 155 160 165  
 att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga 575  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
 170 175 180  
 agctggcaca tcttgaagg tccgtcctgc tcggttttc gcttgaacat tcccttgatc 635  
 tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695  
 gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt gtggggacac 755

agtcgggttg acccagggct gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815  
 tcttgctccc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt 875  
 tgttatgggt ttttttgcg gggggggttg cttttttctg ggtctttga gctccaaaaa 935  
 aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995  
 aaaattcggg cggccgcc 1013

<210> 2

<211> 379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> H chain V region of humunized mause antibody

<223>

<400> 2

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15 -10 -5

gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc 96  
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1 5 10

agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gct agt cag gat gtg 144  
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val

15 20 25

aat act gct gta gcc tgg tac cag cag aag cca gga aag gct cca aag 192  
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30 35 40 45

ctg ctg atc tac tcg gca tcc aac cgg tac act ggt gtg cca agc aga 240  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg

50 55 60

ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc 288  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
                     65                    70                    75  
 ctc cag cca gag gac atc gct acc tac tac tgc cag caa cat tat agt 336  
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser  
                     80                    85                    90  
 act cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa c 379  
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                     95                    100                    105

<210> 3

<211> 418

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> H chain V region of humunized mause antibody

<223>

<400> 3

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
                     -1 1                    5                    10  
 cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                     15                    20                    25

act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt 240  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60  
 cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atg acc gca gac aag tcc acg agc 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 65 70 75  
 aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 95 100 105  
 tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; H chain V region of humunized mause antibody

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly	
-15 -10 -5	
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
-1 1 5 10	
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

210 5

211 180

212 PRT

213 Human

400 5

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly

1 5 10 15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35 40 45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

65 70 75 80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

85 90 95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

100 105 110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130 135 140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145 150 155 160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165 170 175



Ala Leu Leu Gln

180

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; TRP

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; H chain V region of humunized mause antibody

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15

-10

-5

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1

5

10

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val

15

20

25

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30

35

40

45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg

50

55

60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser

65

70

75

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser

80

85

90

Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 139

<212> TRP

<213> Artificial Sequence

<220> H Chain V region of humunized mause antibody

<223>

<400> 7

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

<210> 8

<211> 239

<212> TRT

<213> Artificial Sequence

<220> H Chain V region of humnized mause antibody

<223>

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15 -10 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04645

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K39/395, A61K45/00, A61K38/20, A61K38/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K39/395, A61K45/00, A61K38/20, A61K38/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OZAKI K. et al., "Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, anti-HM1.24." Tokushima J Exp Med, 1996, Vol. 43, No. 1-2, pages 7 to 15	1-19
A	GOTO, T. et al., "A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells." Blood, 1994, Vol. 84, No. 6, pages 1922 to 1930	1-19
P, A	OZAKI S. et al., "Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24." Blood, 15 Oct 1997, Vol. 90, No. 8, pages 3179 to 3186	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 December, 1998 (28. 12. 98)Date of mailing of the international search report  
19 January, 1999 (19. 01. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/04645

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395, A61K45/00, A61K38/20, A61K38/21

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395, A61K45/00, A61K38/20, A61K38/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	OZAKI K. et al., 'Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, anti-HM1.24.' Tokushima J Exp Med, 1996, Vol. 43, No. 1-2, pages 7 to 15	1-19
A	GOTO T. et al., 'A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells.' Blood, 1994, Vol. 84, No. 6, pages 1922 to 1930	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 12. 98

国際調査報告の発送日

19.01.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	OZAKI S. et al., 'Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24.' Blood, 15 Oct 1997, Vol.90, No.8, pages 3179 to 3186	1-19